

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-252075

(43)Date of publication of application : 01.10.1996

(51)Int.Cl.

A23L 1/23

A23L 1/227

A23L 1/238

(21)Application number : 07-057055

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 16.03.1995

(72)Inventor : TARUMI KYOKO  
OKAMURA HIDEKI  
NANATANE TADAAKI  
KATAOKA JIRO

## (54) ENZYMATIC DECOMPOSITION TYPE SEASONING

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a seasoning improved in taste by treating a product with pyroglutamyl aminopeptidase and/or 5-oxoprolinase, wherein the product is obtained by treating a protein with the culture product of *Aspergillus*.

CONSTITUTION: A protein (wheat, deoiled soybean, etc.) is treated with the culture product of *Aspergillus*, and the obtained product is treated with pyroglutamyl aminopeptidase and/or 5-oxoprolinase. Pyroglutamic acid and pyroglutamyl peptide are also converted into glutamic acid and other amino acids to improve the taste.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-252075

(43) 公開日 平成8年(1996)10月1日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 L 1/23			A 2 3 L 1/23	
1/227			1/227	B
1/238	1 0 3		1/238	1 0 3

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平7-57055

(22) 出願日 平成7年(1995)3月16日

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72) 発明者 垂水 恭子

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社食品総合研究所内

(72) 発明者 岡村 英喜

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社食品総合研究所内

(72) 発明者 七種 忠明

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社食品総合研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素分解型調味料

(57) 【要約】

【目的】 呈味性の低い蛋白加水分解物に存在するピログルタミルペプチドを分解し、呈味性の高い調味料を提供する。

【構成】 本発明の特徴はピログルタミルアミノペプチダーゼ及び／又は5-オキソプロリナーゼを、麹菌培養物により調製した蛋白加水分解物に作用させて、前記ピログルタミルペプチドを加水分解することにある。これにより、呈味に重要な影響を与えるグルタミン酸を大量に遊離でき、従来にはない優れた呈味力を有する調味料を得ることができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 麹菌培養物に含まれる蛋白分解酵素を基質となる蛋白質に作用させて得た蛋白加水分解物に、更に（１）ピログルタミルアミノペプチダーゼ及び／又は（２）５-オキソプロリナーゼを作用させて得られる調味料。

【請求項2】 蛋白加水分解物がピログルタミルペプチドを含有する請求項1記載の調味料。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は酵素の作用により得られる調味料に関するものである。本発明の調味料は、

（１）アミノ酸及び低分子ペプチドを含有するばかりでなく、（２）さらに呈味性を持たないピログルタミン酸及びピログルタミルペプチドを全てグルタミン酸及びその他アミノ酸に変換した、極めて呈味性が高い調味料である。本発明の調味料は、各種の食品に使用できる調味料として、あるいは各種の調味料の原料として広範囲の用途が期待される。

## 【0002】

【従来の技術】これまで知られている天然調味料は、蛋白の分解を経て行われるもの、いわゆる分解型天然系調味料が主流であった。この分解型天然調味料には酸分解型と酵素分解型がある。酸分解型調味料には、大豆、小麦などの植物性蛋白を原料として得られるHydrolyzed Vegetable Protein（以下、HVPと略記することがある。）と、ゼラチン、乳カゼインなどの動物性蛋白を原料として得られるHydrolyzed Animal Protein（以下、HAPと略記することがある。）がある。

【0003】しかしながら、一般に酸加水分解によりHVP、HAPを得る場合の反応条件は通常、100℃で1～2日間である。このように、高温での長時間反応はエネルギー消費量が大きく、又装置の腐食をきたすという問題点がある。更に、酸による蛋白の加水分解は簡便である一方、異臭の発生やアミノ酸の過剰分解、中和のために高塩分となるなどの欠点もある。

【0004】そこで、近年では原料の風味を有効に生かすために蛋白分解酵素を利用した製造法が検討されている。即ち、酵素分解型調味料としてはこれまでに、卵白を酵素分解したもの（特開昭48-68773）、脱脂大豆を酵素分解したもの（特開昭51-70852）、チーズホエーを原料として酵素分解したもの（特開昭62-151155）、コーングルテンミールを酵素分解したもの（特公平2-295437）などが報告されている。

【0005】ところで、同一の基質タンパク質を用いても、蛋白分解酵素の種類によって切断部位が異なるため、分解生成物の呈味に差が生じる場合がある。すなわち、遊離アミノ酸の生成度、生成したペプチドの分子

量、アミノ酸組成、その配列順序等によって呈味性が異なってくる。これにより、以下に述べるような問題が生じる。例えば、大豆蛋白の場合、エンドペプチダーゼ活性の強い酵素を作用させると、一般に苦みが生成しやすい（石田賢吾ら、食品工誌、28、524（1976））。苦味の生成は、エンドペプチダーゼの食品加工への応用における最大の難点であり、苦味を生成しない酵素分解法が望まれる。

【0006】この問題に対して、ミルクカゼインや大豆蛋白での研究において、エンドペプチダーゼ処理によって生成した苦味ペプチドを微生物由来のエキソペプチダーゼで更に処理することにより、各種アミノ酸が遊離し、特にアミノ末端のロイシン、バリン、フェニルアラニン、カルボキシル末端のロイシン、フェニルアラニン、バリンなどが遊離し、苦味が著しく低下し、うま味が増大するという報告がある（食品工業と酵素、一島英治編、p102、朝倉書店）。

【0007】また、醤油においてはエンドペプチダーゼ及びエキソペプチダーゼによって原料タンパク質から遊離されたグルタミンは麹菌の生産するグルタミナーゼによってグルタミン酸に変換されないと、うま味のないピログルタミン酸が生成し、うま味の主体であるグルタミン酸が減少してしまうという難点も報告されている（醤油の化学と技術、栃倉辰六郎編、p181、日本醸造協会）。更に、醤油においては未分解のペプチドとしてグリシルプロリン、グリシルアスパラギン酸、グリシルグルタミン酸、グルタミルプロリン、グルタミルグリシン、グルタミルグルタミン酸等のペプチドの残存が確認され（醤油の科学と技術、栃倉辰六郎編、p176、日本醸造協会）、それらの残存が醤油の呈味を低下させている原因であるとも考えられている。

【0008】上述した問題に対して、グルタミナーゼ活性の高い醤油麹の探索（醬研、Vol. 8、No. 3、1982）や、耐熱性グルタミナーゼの製造法（特公昭49-48759）、耐塩性グルタミナーゼの製造法（特開昭63-94975、特開平2-261379）、味噌醸造への応用（J. Brew. Soc. Japan, Vol. 86, No. 7, p529（1991））等の試みがなされている。更に、上記ペプチドをペプチダーゼにより分解し蛋白加水分解物中のグルタミン酸遊離率（グルタミン酸濃度（重量／容量）／総窒素（重量／容量））を向上させる取り組みも報告されている（特願平5-300804）。

【0009】しかし、醤油醸造の例などに見られるように、酵素法による蛋白加水分解は多大の労力と時間を要するにも拘わらず、アミノ酸遊離率も低く、特に大豆蛋白中に最も多量に含有され、かつ呈味性に重要なグルタミン酸の遊離率が低い。従って、呈味に重要な影響を与えるグルタミン酸を大量に遊離する技術は現時点では確率されていない。

## 【0010】

【本発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は従来の酵素分解型調味料に比較して、アミノ酸遊離率、とりわけグルタミン酸の遊離率が高い調味料の提供である。

## 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、蛋白加水分解物中から上記ペプチド以外のグルタミン酸関連物質を分離、同定、定量し、それらを酵素により分解することにより、グルタミン酸遊離率を向上すべく鋭意検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、麹菌培養物に含まれる蛋白分解酵素を蛋白質に作用させて得た蛋白加水分解物に、更に（１）ピログルタミルアミノペプチダーゼ及び／又は（２）５-オキソプロリナーゼを作用させて得られる調味料である。以下に本発明を詳細に説明する。

【0012】まず、グルタミン酸関連物質の分離、同定、定量について簡単に述べる。前記蛋白の蛋白加水分解物を分子量１万カットの限外濾過膜により高分子を除去し、外液を、①強塩基性陰イオン交換カラムクロマトグラフィー（AG1-X8カラム、バイオラッド社製）、②逆相カラムクロマトグラフィー（CAPCELLPAK C18、資生堂社製）、③質量分析計（JMS-HX110/HX110 TANDEM MASS SPECTROMETER）の順に供しグルタミン酸関連物質の解析を行った。その結果、これまで蛋白加水分解物中に、その存在が知られていなかったピログルタミルペプチドの存在を発見した。すなわち、本ピログルタミルペプチドは、そのアミノ基末端にピログルタミン酸が存在し、分子量で約250～3,000のオリゴ及びポリペプチド画分に含まれる。例えば、pGlu-Glu、pGlu-Asp等のジペプチドからpGluにアミノ酸が約20個結合したポリペプチド群であった。

【0013】本発明の特徴は、これらのピログルタミルペプチドにピログルタミルアミノペプチダーゼ及び／又は５-オキソプロリナーゼを作用させることにある。これにより、グルタミン酸やその他アミノ酸の遊離率を向上せしめることができ、その結果として呈味性の向上した蛋白加水分解物が得られるわけである。

【0014】本発明の調味料を得るには、まず麹菌を培養して得られる蛋白加水分解酵素を含む培養物又はその分画物を原料となる蛋白に作用させて蛋白加水分解物を得ることから始まる。さて、本発明に適用することができる蛋白の種類としては、特に限定されないが、グルタミン酸の含量が高いものが好ましい。また、蛋白原料としては純粋な蛋白には限られず、蛋白を多く含有するのであればよい。具体的には脱脂大豆、分離大豆蛋白、小麦等が挙げられ、これらは単独又は２種を適宜組み合わせ用いられる。もちろん、これら以外の蛋白原料を用いても構わない。また、蛋白原料の酵素処理前の予備

処理は特に限定されないが、好ましくは界面活性剤や有機溶媒などを用いて脱脂することが望ましい。

【0015】次に、上述の蛋白原料に麹菌を培養して得られる蛋白加水分解酵素を含む培養物又はその分画物を作用させて蛋白加水分解物を得るわけであるが、この時に用いられる麹菌としては特にその種類は問わず、通常醸造工業に於て用いられているものを用いればよい。具体的には、アスペルギリウス・オリゼ、アスペルギリウス・ソーヤ、アスペルギリウス・タマリ等を用いればよい。尚、本発明に於いては、可能な限り短時間に分解を終了させる為に、麹菌の培養物としては、そのプロテアーゼ活性を乳製カゼインを基質とするアンソン・萩原らの変法（Hagiwara, B. et al., J. Biochem. 45, 165 (1958)）の記載を参照）に従って測定した場合、液体麹の場合200ユニット/ml、固体麹の場合1,000ユニット/g・麹以上の活性を保有する培養物が好ましい。繰り返し述べるが、麹菌を培養して得られる蛋白加水分解酵素を含む培養物を遠心分離、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー等の手法により分画した分画物を用いても構わない。

【0016】このような蛋白に麹菌培養物に含まれる酵素群、その分画物を作用させることにより、酵素反応によって蛋白はペプチド、更にはアミノ酸にまで分解される。尚、この酵素反応を効率的に行うために、酵素群またはその分画物と蛋白原料とを水溶液中で共存させることが好ましい。この際、攪拌しながら反応を行ってもよい。この酵素反応は、酵素濃度や蛋白原料によっても異なるが、例えば、10～60℃、好ましくは30～50℃にて3～11日間、好ましくは5～10日間行えば良い。また、蛋白加水分解酵素と蛋白原料とを含む水溶液は、緩衝液等を用いてpH5～9、好ましくはpH6～8に調整するのが望ましい。

【0017】さて、反応終了後、未反応の原料蛋白などの不溶物は遠心分離や濾過などの従来の分離法を用いて除去すればよい。生成した蛋白分解液は、アミノ酸分析、ニンヒドリン定量、及び酵素処理の前後における重量比較等による重量分解率の測定等を行うと良い。

【0018】次に、上記のようにして得られた蛋白加水分解物に、ピログルタミルアミノペプチダーゼ及び／又は５-オキソプロリナーゼを作用させる。ピログルタミルアミノペプチダーゼ、５-オキソプロリナーゼは精製品、及び粗精製品を用いても良いが、通常は微生物の培養液をそのまま使用すればよい。即ち、ピログルタミルアミノペプチダーゼを含む納豆菌（バチルス・ズブチリス）の培養物及び／又は５-オキソプロリナーゼを含むパン酵母（サッカロミセス・セレビシエ）培養物を水溶液中で上記蛋白加水分解物と共存させればよい。また、この際、攪拌しながら反応を行ってもよい。

【0019】本発明に於いては、ピログルタミルアミノペプチダーゼを含む納豆菌（バチルス・ズブチリス）と

しては、特にその種類は問わず、通常、醸造工業で用いられる納豆菌を用いればよい。また、5-オキソプロリナーゼを含むパン酵母（サッカロミセス・セレビシエ）としては、特にその種類は問わず、通常、醸造工業で用いられているパン酵母を用いればよい。

【0020】尚、本発明に於いては、可能な限り短時間に分解を終了させる為に、納豆菌（バチルス・サチルス）培養物としては、そのピログルタミルアミノペプチダーゼ活性をpGlu-Alaを基質とするドリトルらの方法（Meth. Enzymol. 19, 555（1970）の記載を参照）に従って測定した場合、5mU以上の活性を保有する培養物が好ましい。同様に、パン酵母（サッカロミセス・セレビシエ）培養物としては5-オキソプロリナーゼ活性を<sup>14</sup>Cオキソプロリンを基質とするファンデルワースの方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2982（1971）の記載を参照）に従って測定した場合、10mU以上の活性を保有する培養物が好ましい。

【0021】ピログルタミルアミノペプチダーゼを含む納豆菌（バチルス・ズブチリス）の培養物及び／又は5-オキソプロリナーゼを含むパン酵母（サッカロミセス・セレビシエ）培養物を作用させる場合の反応条件は特に固定されないが、通常、10～60℃、好ましくは30～50℃にて3～48時間、好ましくは24～30時間行えば良い。また、これらの酵素と蛋白加水分解物を含む水溶液は、緩衝液等を用いてpH5～9、好ましくはpH6～8に調整するのが望ましい。このようにして、得られた反応液はそのままで、又必要により乾燥することにより、グルタミン酸の遊離率の高い調味料が得られるわけである。

【0022】

【実施例】以下に本発明を実施例に従って説明する。尚、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0023】（実施例1）：蛋白加水分解物の調製及びピログルタミルペプチドの分離

まず、最初に使用した蛋白加水分解物の調製について述べる。すなわち、5%（重量／容量）のアジプロンSU（脱糖分離大豆蛋白、味の素（株）製）溶液2Lに、1.5%（重量／容量）アジプロンE3（分離大豆蛋白、味の素（株）製）、及び0.5%（重量／容量）リン酸水素1カリウムを含む培地にて、30℃、120rpm、48時間、往復振とう培養した麹菌（*Aspergillus oryzae* ATCC 22788）培養物を1L添加し、40℃にて10日間、食塩非存在下で酵素分解反応を行った。ついで反応液を7,000rpmにて10分間遠心分離の後、2.8Lの蛋白加水分解物を得た。

【0024】以上のようにして調製した蛋白加水分解物500mLを分子量1万カットの限外濾過膜により高分子を除去し、外液として400mL得た。得られた外液100mLを強塩基性陰イオン交換カラムクロマトグラ

フィー（AG1-X8カラム、260mmφ×700mm、バイオラッド社製）にて分画した。溶出は水洗後、流速80mL/hrにて0.05M酢酸、0.2M酢酸、2.0M酢酸、1.0N塩酸で段階的に行い、A280を測定し、2.0M酢酸、1.0N塩酸で溶出されるピークを50mL分取した。次に、得られた画分200μLを逆相カラムクロマトグラフィー（CAPCELL PAK C18、4.6φ×250mm、資生堂社製）に供し、A214を測定し、そのピークを2mL分取した。さらに、得られた試料を乾燥後、質量分析計（JMS-HX110/HX110 TANDEM MASS SPECTROMETER）にて構造解析した。

【0025】その結果、これまで蛋白加水分解物中に、その存在が知られていなかったピログルタミルペプチドの存在を発見した。すなわち、本ピログルタミルペプチドは、そのアミノ基末端にピログルタミン酸が存在し、分子量で約250～3,000のオリゴ及びポリペプチド画分に含まれた。例えば、pGlu-Glu, pGlu-Asp等のジペプチドからpGluにアミノ酸が約20個結合したポリペプチド群であった。次に、実施例2に於いて、このピログルタミルペプチドにピログルタミルアミノペプチダーゼ及び5-オキソプロリナーゼを作用させてグルタミン酸を大量に分離させた手法を述べる。

【0026】（実施例2）：ピログルタミルアミノペプチダーゼ及び5-オキソプロリナーゼを作用による調味液の製造

5%（重量／容量）のアジプロンSU（脱糖分離大豆蛋白、味の素（株）製）溶液2Lに、1.5%（重量／容量）アジプロンE3（分離大豆蛋白、味の素（株）製）、及び0.5%（重量／容量）リン酸水素1カリウムを含む培地にて、30℃、120rpm、48時間、往復振とう培養した麹菌（*Aspergillus oryzae* ATCC 22788）培養物を1L添加し、40℃にて10日間、食塩非存在下で酵素分解反応を行った。ついで反応液を7,000rpmにて10分間遠心分離の後、2.8Lの蛋白加水分解物を得た。

【0027】得られた蛋白加水分解物1.0Lに、ピログルタミルアミノペプチダーゼ活性を5mU保有する納豆菌（バチルス・サチルス ATCC 6051）培養物を100mL、5-オキソプロリナーゼ活性を10mU保有するパン酵母（サッカロミセス・セレビシエ ATCC 15248）培養物を100mL添加し、40℃にて24時間酵素反応を行った。次いで、分解物を遠心分離し分解濾液を得た。分解濾液の総窒素、フォルモール態窒素、グルタミン酸量を定量した結果を表1に示す。

【0028】

【表1】

表-1

分析項目	分析値 (括弧内は酵素無添加区)
総窒素 (g/dl)	0.51 (0.52)
フォルモール態窒素 (g/dl)	0.33 (0.26)
フォルモール態窒素/総窒素 (%)	65 (50)
グルタミン酸 (g/dl)	0.62 (0.41)
グルタミン酸/総窒素 (g/dl)	1.22 (0.78)

【0029】表に示されるように、酵素無添加区に比べると、フォルモール態窒素/総窒素として示される分解率及びうま味を呈するグルタミン酸量の顕著な増加から、顕著に呈味性が向上していることがわかる。従って、得られた分解濾液はそのままでも優れたアミノ酸液調味料として使用することができる。また、1.22というグルタミン酸/総窒素の数値は、従来の醤油（当該数値が約0.6）に比べて画期的に高い数値である。

【0030】

【発明の効果】本発明によれば、麹菌の培養物を蛋白に作用させて得られる蛋白加水分解物にピログルタミルアミノペプチダーゼを含む納豆菌（バチルス・サチルス）培養物及び／又は5-オキソプロリナーゼを含むパン酵母（サッカロミセス・セレビシエ）培養物を作用させることにより、残存するピログルタミルペプチドを分解し、分解率が低く、呈味性の弱かった蛋白加水分解物を分解率が高く、かつグルタミン酸含有量の高い、呈味性に優れた調味料を得ることができる。

フロントページの続き

(72)発明者 片岡 二郎

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社食品総合研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

### **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.